

学校编码: 10384

学号: 200425145

分类号_____密级_____

UDC _____

廈門大學

硕士学位论文

界面杂交与功能纳米结构生物体系的研究

The Investigation of Interfacial Hybridization and Functional

Nanostructured Biointerfaces

梁金玲

指导教师姓名: 林仲华教授

周剑章博士

专业名称: 物理化学

论文提交日期: 2007年10月

论文答辩日期: 2007年10月

学位授予日期: 2007年 月

答辩委员会主席: _____

评阅人: _____

2007年10月

厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。
本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

2007 年 10 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

目 录

摘要.....	I
Abstract	IV
第一章 绪论.....	1
1.1 DNA 界面杂交的研究进展	1
1.2 功能纳米结构生物体系的研究进展	7
1.2.1 功能纳米结构生物体系	8
1.2.2 纳米结构生物体系的构筑	13
1.2.3 纳米结构生物体系的表征	16
1.3 本论文的设想和目的	16
参考文献	18
第二章 实验.....	30
2.1 主要试剂	30
2.2 电极和电解池	31
2.3 实验条件	32
2.4 实验仪器	32
第三章 界面电场对 DNA 杂交过程的影响.....	35
3.1 引言	36
3.2 寡聚核苷酸探针分子自组装单层的制备和组装量的测量 ..	37
3.3 EQCM 对 DNA 杂交过程的实时检测	40
3.4 EQCM 研究界面电场对 DNA 杂交的影响.....	42
本章小结	45

参考文献.....	47
第四章 半导体量子点—小牛胸腺 DNA 纳米结构生物体系的荧光性质.....	50
4.1 引言.....	51
4.2 小牛胸腺 DNA 保护的 CdS 量子点的制备与表征.....	52
4.2.1 CdS 量子点的制备.....	52
4.2.2 CdS 量子点的谱学表征.....	54
4.3 CdS 量子点—小牛胸腺 DNA 纳米结构生物体系的荧光性质.....	60
4.3.1 荧光光谱.....	60
4.3.2 影响 CdS 量子点—小牛胸腺 DNA 纳米结构生物体系的荧光增强的因素.....	65
本章小结.....	67
参考文献.....	69
作者在攻读硕士学位期间发表的论文.....	73
致谢.....	74

Catalog

Chinese Abstract	I
English Abstract	IV
Chapter 1 Introduction	1
1-1 Progress of Interfacial DNA Hybridization.....	1
1-2 Progress of Functional Nanostructured Biointerfaces.....	6
1-2-1 Functional Nanostructures for Biointerfaces.....	8
1-2-2 Assembly of Nanostructured Biointerfaces.....	13
1-2-3 Characterizations of Nanostructured Biointerfaces.....	16
1-3 Plan and Aim of This Thesis.....	16
Reference.....	18
Chapter 2 Experiment	30
2-1 Reagent.....	30
2-2 Electrode.....	31
2-3 Condition of Experiment.....	32
2-4 Appareyus of Experiment.....	32
Reference.....	32
Chapter 3 Effect of Interfacial Field on DNA Hybridization	35
3-1 Introduction.....	36
3-2 Preparation of Self -assembled Monolayer of Probe DNA and Characterizations of Probe DNA Density on Electrode Surface.....	37

3-3 In Situ Characterization of DNA Hybridization Utilizing QCM·····	40
3-4 Effect of Interface Electric Field on DNA Hybridization Studied by EQCM·····	42
Conclusion·····	45
Reference·····	47
Chapter 4 PL Properties of Semiconductor QDs-CT DNA Functional Nanostructured Biointerfaces·····	50
4-1 Introduction·····	51
4-2 Preparation and Characterization of CdS QDs Protected by CT DNA ·····	52
4-2-1 Preparation of CdS QDs·····	52
4-2-2 Characterization of CdS QDs·····	54
4-3 Photoluminescent Properties of CdS QDs-CT DNA Nanostructured Biointerfaces·····	60
4-3-1 PL Spectrum ·····	60
4-3-2 Factors Influencing PL Enhancement of CdS QDs-CT DNA Nanostructured Biointerfaces·····	65
Conclusion·····	67
Reference·····	69
Publication of Author·····	73
Thanks·····	74

摘要

界面杂交与功能纳米结构生物体系的研究

近年来, DNA 界面杂交模型与功能纳米结构生物体系的构筑, 及其界面生物电化学研究已成为生物传感器和生物芯片研究的热点之一。在基因生物传感器的研究中, 由于粒子-界面相互作用、界面浓度梯度及位阻现象等原因, 使得该固-液相界面反应的热力学及动力学性质与溶液相的相比存在较大的差异。因而, 研究固-液界面上的 DNA 杂交对基因生物传感器的设计具有重要的意义。同时, 生物分子与具有独特光学、电子学、磁学或催化性质的半导体纳米结构材料相结合, 可构建功能化纳米结构生物体系, 该体系在生物学研究和医学诊断中具有诱人的应用前景; 研究生物分子与半导体纳米材料的相互作用, 有利于构建各种各样简单、高选择性和高灵敏度的功能纳米结构体系, 并考察纳米材料对生物分子生化功能的影响, 即生物分子自身的安全性。

本文的工作围绕着 DNA 界面杂交和功能纳米结构生物界面的研究展开, 主要进行了以下两方面的工作: (I) 采用电化学石英晶体微天平 (EQCM) 现场监测不同界面电场下完全匹配的靶标 DNA 和不完全匹配的靶标 DNA 分别与寡聚核苷酸探针分子杂交的过程, 考察了不同界面电场对杂交效率的影响, 并进一步探讨了引入界面电场后探针分子取向和微观作用力对 DNA 杂交的影响; (II) 利用天然小牛胸腺 DNA 作为模板及保护剂, 制备 CdS 量子点-DNA 生物缀合物, 考察了其荧光性质。研究取得以下主要结果:

一、采用 EQCM 研究界面电场对 DNA 杂交的影响

1、控制合适的正电位, 通过库仑吸引力富集靶标 DNA 到工作电极附近, 增大了与探针分子杂交的几率。但此时, 探针分子在电极表面为平躺吸附取向, 该取向使探针分子与电极表面的非特异性吸附达到最大, 从而大大减弱了 DNA 杂交的特异性, 容易导致假阳性。

2、控制合适的负电位, 使探针分子在电极表面保持垂直吸附取向, 该取向

使探针分子与电极表面的非特异性吸附达到最小,有利于保持 DNA 杂交的特异性,从而有效抑制假阳性。

3、因无需在电极表面修饰烷基硫醇分子,电极表面探针分子的覆盖度高达 $2.2 \times 10^{13} \text{ molecules} \cdot \text{cm}^{-2}$,不但简化了操作步骤,还提高了检测的灵敏度。

二、研究了 CdS 量子点—小牛胸腺 DNA 纳米结构生物体系的荧光性质

1、分别用 ssDNA 和 dsDNA 作模板,制备了纳米 CdS—DNA 溶胶,构建了 CdS 量子点—DNA 纳米结构生物体系, DNA 也起到了 CdS 量子点保护剂的作用。

2、紫外—可见吸收光谱表明,用焦磷酸钠、ssDNA 或 dsDNA 作保护剂所制备的 CdS 量子点吸收的启动 (on set) 波长很接近,与块体材料相比,蓝移了 45nm,表现出量子尺寸效应; dsDNA 或 ssDNA 的量在 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \sim 350 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的范围内对所制备的 CdS 量子点尺寸和产量影响不大。红外光谱表明,与小牛胸腺 DNA 相比, CdS—dsDNA 和 CdS—ssDNA 纳米结构生物体系中归属于 DNA 的一些特征峰位置几乎没有发生位移, CdS 量子点可能不会造成 DNA 的损伤。光电流谱表明,焦磷酸钠保护的 CdS 量子点的光电流信号很显著,而 ssDNA 或 dsDNA 保护的 CdS 量子点由于表面缺陷态密度较大,几乎检测不出光电流信号。

3、荧光光谱试验结果表明:

(1)用 DNA 作保护剂,增强了 CdS 量子点的荧光光谱强度,表现为: $I_{\text{CdS-Na}_4\text{P}_2\text{O}_7} < I_{\text{CdS-dsDNA}} < I_{\text{CdS-ssDNA}}$ 。

(2) CdS—DNA 的荧光强度随 DNA 量 (在 $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \sim 350 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内) 的增加而增强。

(3) 解释了 DNA 对 CdS 量子点的荧光增强作用机理:

A、由于 DNA 的磷酸骨架具有一定的刚性,使吸附在带负电荷的 DNA 磷酸骨架上的 CdS 量子点相互间碰撞的几率比自由时小得多,同时 CdS 量子点在磷酸骨架上的排列也比自由时有序。这两个因素有利于提高了荧光的量子产率; dsDNA 上 CdS 量子点间的距离比 ssDNA 上的近,故其相对容易发生碰撞,导致荧光光谱强度较后者弱。

B、本实验测得的 CdS 量子点的荧光谱带是表面缺陷态引起的,而光电流谱的实验表明, CdS 量子点的表面缺陷态密度顺序是: $\text{CdS} - \text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 < \text{CdS} -$

dsDNA<CdS—ssDNA，该顺序正好与 CdS 量子点的荧光光谱强度的顺序一致。

关键词：DNA；界面杂交；纳米结构生物体系

厦门大学博士论文摘要库

Abstract

The Investigation of Interfacial Hybridization and Functional Nanostructured Biointerface

Recently, the research interests in the biosensors and biochips are focused on the fabrication of functional nanostructured biointerfaces and model of DNA interfacial hybridization, and the fundamental understanding of the interfacial bioelectrochemical processes within these systems. Thermodynamics and kinetics of the interface reaction may substantially differ compared to the same reaction in bulk solution as a result of the species–interface interaction, interfacial concentration gradients and steric hindrance in the investigation of gene biosensors. So it is very important to investigate the DNA hybridization on solid–liquid interface for the design of gene biosensors and nanostructured biointerfaces. At the same time, Semiconductor nanomaterials typically have the unique optical, electronic, magnetic, and catalytic properties. Thus, the architecture of functional nanostructures biointerfaces, which are fabricated by semiconductor nanomaterials and biomolecules, has potential applications for biological application and medical diagnosis. The research of interaction between semiconductor nanomaterials and biomolecules is propitious to fabricate various functional nanostructured biointerfaces with simple, highly selectivity and sensitivity. The biochemical functional effects of nanostructured materials on biomolecules, namely the security of biomolecules themselves, are studied.

Accordingly, the emphasis of this thesis is placed on investigating the interfacial DNA hybridization and functional nanostructured biointerface. These works can be divided into two parts: (1) the hybridization of oligonucleotides probe with matched or mismatched DNA target was monitored by a combination of electrochemical control and in situ quartz crystal microbalance technique. The influence of different interfacial electricfield on the efficiency of hybridization was investigated. The effect of the orientation of oligonucleotides probe and micro forces on DNA hybridization

under interface electric field was discussed; (2) The DNA–template method was used to prepare CdS QDs (Quantum dots)–CT DNA (calf thymus DNA) nanostructured bioconjugates, and their photoluminescent (PL) properties were investigated. The main results are summarized as follows:

1. The influence of different interfacial electricfield on the efficiency of hybridization investigated by electrochemical quartz crystal microbalance (EQCM) technique

(1) Under the condition of controlling a suitable positive potential, target DNA will be enriched around the working electrode, which improves the rate of hybridization of oligonucleotides probe with target DNA. It's found that at this condition the orientation of probe DNA adsorbed on the electrode surface is parallel, and the orientation leads to the maximum nonspecific adsorption between probe DNA and electrode surface. Thus, the specificity of DNA hybridization is weakened, which leads to “false positives”.

(2) The orientation of probe DNA adsorbed on the electrode surface is perpendicular by means of an appropriate negative potential. This orientation leads to the minimum nonspecific adsorption between probe DNA and electrode surface, which is propitious to keep the specificity of DNA hybridization and can availably halt hybridization for mismatched target DNA.

(3) Because it does not need to modify the electrode surface by alkanethiols, the surface coverage of probe DNA is as high as 2.2×10^{13} molecules·cm⁻², which predigests the process of preparation and enhances the sensitivity of detection.

2. Investigation of PL properties of CdS QDs–CT DNA nanostructured biointerface

(1) Utilizing the electrostatic attraction, CdS QDs–DNA nanostructured biointerfaces were prepared by using dsDNA or ssDNA as a template of CdS QDs. In addition, DNA, onto which CdS QDs were attached, acted as a protecting agent.

(2) The UV–vis absorption spectra show that a similar on–set wavelength of CdS QDs protected by sodium pyrophosphate, dsDNA or ssDNA. The absorption onset of

these CdS QDs blueshift about 45 nm compared with that of the bulk CdS, which indicates a quantum size effect. In addition, the size and production of CdS QDs were almost not affected by different dsDNA or ssDNA concentration within the range of $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ to $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. In the IR spectra, the characteristic peaks of DNA from the nanostructured biointerfaces of CdS QDs–dsDNA or CdS QDs–ssDNA almost don't show any shift compared with those from CT DNA. Thus, it is likely that CdS QDs haven't made any damage on DNA. The photocurrent spectra indicate that a remarkable photocurrent signal of CdS QDs capped with sodium pyrophosphate was observed. But the photocurrent signal of CdS QDs protected by DNA was hardly observed, due to many surface defect states.

(3) The analysis on PL spectra shows that:

(A) The PL enhancement effect of DNA on CdS QDs is expressed as follows:

$$I_{\text{CdS-Na}_4\text{P}_2\text{O}_7} < I_{\text{CdS-dsDNA}} < I_{\text{CdS-ssDNA}}.$$

(B) The PL intensity of CdS QDs –DNA enhances while increasing the DNA concentration within the range of $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ to $300 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

(C) The factors of the PL enhancement effect of DNA on CdS QDs are:

(a) The phosphate backbone of DNA has a certain rigidity. The rate of collisions between CdS QDs on the phosphate backbone with negative charge is far less than that in unrestricted space, which leads to more ordered array of CdS QDs. These two factors enhance the PL quantum yield. The distance between the CdS QDs adsorbed on dsDNA is shorter than that on ssDNA. Thus, the CdS QDs adsorbed on dsDNA are easier to collide, which leads to a weaker intensity of PL.

(b) The PL spectral band of CdS QDs observed is due to surface defect states. The intensity sequence of surface defect states of CdS QDs from photocurrent spectra is: $\text{CdS-Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 < \text{CdS-dsDNA} < \text{CdS-ssDNA}$, which is consistent with that from PL spectra.

Key words: DNA; Interfacial Hybridization; Nanostructured Biointerface

第一章

绪论

在过去的 20 年里,生物电化学技术被证实是研究生物分子的电化学性质和原理的重要方法,是开发生物芯片和生物电子学体系的有力手段^[1-6]。近年来,DNA 界面杂交模型和功能纳米结构生物体系的构筑,及这些体系在界面生物电化学的研究和生物传感器的设计中的应用已成为生物电化学领域的研究热点^[7]。在电极表面上构建生物体系的研究最近取得了令人兴奋的发展,此项研究的目的是在生物分子、电极,或两者的表面加入一些具有生物相容性的成分,构建一种可控的、灵敏的新型生物电化学器件,并通过该器件能更好的识别生物分子和电极之间的相互作用^[8-11]。

1.1 DNA 界面杂交的研究进展

由于粒子-界面相互作用、界面浓度梯度及位阻现象等原因,这种固-液相界面反应与溶液相中同样的反应相比,热力学及动力学性质有很大不同^[12]。而 DNA 生物传感器及基因芯片作为一种界面装置,修饰在固体表面的 DNA 探针分子与溶液中靶标 DNA 的固-液的界面杂交亦存在这样的问题。因此,研究 DNA 的界面杂交对 DNA 生物传感器的研究具有重要的意义,目前已有许多科研工作者研究离子强度、基体表面 DNA 探针的覆盖度、探针 DNA 和靶标 DNA 的长度、探针与靶标杂交位点、探针吸附取向和 DNA 界面电场等对界面杂交动力学、亲和力和常数及杂交效率的影响^[12-22]。

一、离子强度的影响

Vainrun 等发展了可应用于溶液中粒子与荷电表面上固定的粒子发生化学反

应的热力学理论。首先,他们推导出表面对反应吉布斯自由能(Gibbs free energy)影响的热力学方程,由于DNA分子中有亲水性基团及沟槽,溶液及离子可渗透进入DNA分子,因此将DNA单链及杂交双螺旋视为可渗透的球体颗粒模型,用可渗透离子的带电球体与带电平板在电解质溶液中静电作用的线性泊松-玻耳兹曼方程理论^[23],得到相互作用的吉布斯自由能解析解,进而得到表面对于平衡反应常数、焓和熵影响的方程。并将该热力学理论用于估计在高离子强度($1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaCl}$)及较低离子强度($0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaCl}$)时DNA芯片的表面效应。理论预测表明,DNA芯片中界面杂交热力学存在显著的表面静电效应,尤其是当离子强度较低时,表面静电效应对界面杂交热力学的影响更为显著,控制基体表面在某一正电位下进行杂交,在热力学上有利,并且在低离子强度下杂交可避免在高离子强度(1 M NaCl)下芯片上DNA链发生部分折叠的问题。Vainrub等的理论研究从热力学出发,为基因传感器及DNA芯片设计中的关键技术之一的界面杂交技术完善提供了新的思路和理论依据^[12]。

Herne等^[24]研究离子浓度对末端修饰巯基的寡聚核苷酸(HS-ssDNA)探针分子在金基体上的覆盖度的影响,实验证明,低的离子强度将降低HS-ssDNA探针分子与金基体的吸附作用。Peterson等^[14, 16, 25]通过控制组装溶液的离子强度来调控DNA探针分子在金基体表面的数量和间隔。

二、DNA 探针覆盖度与长度的影响

Peterson等还用表面等离子激元共振(SPR)技术研究金基体上不同密度的DNA探针分子对靶标DNA捕获动力学的影响。实验结果表明:基体上的DNA探针覆盖度相同时,DNA探针与靶标DNA杂交的杂交效率和杂交动力学结果都是可重现的;杂交效率和靶标DNA的捕获动力学取决于基体上的DNA探针的覆盖度和靶标DNA的序列。他们认为受热力学影响的DNA探针的覆盖度可以解释实验中捕获靶标DNA速率的变化。对于完全匹配的靶标DNA的捕获动力学,可以用Langmuir模型进行描述;对于DNA探针分子与不完全匹配靶标DNA的捕获动力学,即使在DNA探针覆盖度很低的情况下也很难用标准的杂交模型来解释,但它的键合等温线与多相模型相匹配,可以用Sips模型来描述^[14, 16, 25]。

Steel 等利用计时库仑分析法定量测定电极表面 DNA 探针的覆盖度,并考察了电极表面 DNA 探针的覆盖度分别与杂交效率、核酸长度(8—48 个碱基)的关系。结果表明:杂交效率随电极表面 DNA 探针覆盖度的增加而增加,且几乎达到 100%,随后杂交效率降低;DNA 探针的长度越大,在电极表面的覆盖度越小,这可能与 DNA 分子间的横向作用力有关^[15, 24]。

三、杂交位点与二级结构的影响

Georgiadis 等运用 SPR 技术对金基体上固定的 HS-ssDNA 探针的杂交动力学进行了研究。用于该研究的几种序列的靶标 DNA 与探针分子杂交的位点各不相同,但形成的双螺旋均具有相同的热力学稳定性。研究表明,短链寡聚核苷酸与靶标 DNA 杂交,一般是先成核,再慢慢形成双螺旋;杂交动力学对杂交发生的位点非常敏感,杂交位点不同,初始成核位点也不一样;DNA 探针分子间的横向相互作用也会影响杂交动力学。因此,合理的 DNA 表面杂交模型的建立亟需进一步深入研究^[22]。

Georgiadis 等最近一项工作是通过紫外吸收光谱和 SPR 技术研究 DNA 二级结构对其杂交动力学的影响。实验表明,溶液中和基体表面的杂交动力学速率常数均会随 DNA 探针和靶标 DNA 二级结构的增多而变小,使杂交速率变慢。传统的二态(two-state)模型已不适用于描述个别含四个或更多分子内配对碱基的 DNA 在溶液中的杂交,但仍然适用于在基体表面的杂交,只是在杂交条件和 DNA 序列相同的情况下,基体表面的杂交速率比溶液中的慢 20—40 倍。为了设计出更好的 DNA 传感器,在探针分子序列的选择上要慎重考虑二级结构的影响^[36]。

四、界面修饰烷基硫醇的影响

在 DNA 生物传感器制备中,用于 DNA 探针分子固定的方法有:吸附法,共聚合法,配位法,共价键合法等。用这些方法固定的 DNA 探针分子都会通过 DNA 的骨架和碱基与基体发生非特异性吸附,从而降低了 DNA 的杂交效率

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库